

M のFcレセプターを介した活性化のケミルミネッセンス法による検出

著者	馬島 敏郎
号	2037
発行年	1988
URL	http://hdl.handle.net/10097/20238

氏 名 (本籍)	馬 ^ま 島 ^{じま} 敏 ^{とし} 郎 ^{ろう}
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 第 2037 号
学位授与年月日	昭 和 63 年 9 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
最 終 学 歴	昭 和 45 年 3 月 山梨大学工学部発酵生産学科卒業

学 位 論 文 題 目	Sensitive detection of two IgG Fc receptors of mouse macrophages by chemiluminescence analysis. (MφのFcレセプターを介した活性化のケミル ミネッセンス法による検出)
-------------	--

	(主 査)
論文審査委員	教授 菅 村 和 夫 教授 今 野 多 助 教授 橘 武 彦

論文内容要旨

〔目 的〕

非特異的免疫機構は食細胞 {白血球や単球, マクロファージ (Mφ)} の異物 (抗原) への遊走, 接着, 貪食により開始されるが, その過程でMφの活性化の機構を解明する必要がある。Mφが活性化すると形態的に, また生化学的に変化がおこり, 病原微生物やガン細胞を死滅させる事が報告されている。然し乍らMφの活性化を細胞表面のレセプターと関連させ記述している報告は少ない。マウスMφには, 細胞表面に3種類のFcγレセプターが存在する事が知られている。それぞれのレセプターはIgGのサブクラスに対する特異性により判別可能である。従来, これらレセプター発現の検査は, 感作ヒツジ赤血球 (EA) を用いて顕微鏡下で観察し, 陽性率を算出するロゼット法が用いられてきた。今回私は, 化学発光法 (Chemiluminescence, CL) を用い, EA添加後励起状態の分子が遷移する際の発光を検出する事によりMφ集団別及びMφのFcγレセプター別の機能の違いを検討した。

〔方 法〕

マウス腹腔Mφ: 刺激剤をip投与後一定日を経たマウスおよび無刺激マウス腹腔に冷メジウム (RPMI 1640, 抗生物質添加) 6 ml を注入し, 腹腔マッサージを行なった後5 ml採取する。細胞は冷却遠心機で2回洗滌 (900 rpm in RPMI) し, トリパンブルー色素排除法で生細胞数を数え, $2 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml に調整, 1 ml をCL測定用チューブに入れ, CO₂ インキュベーター, 37℃で培養。2時間後, 非付着細胞はPBSで洗滌除去し, 付着細胞は5%非働化FCS添加RPMI 1640 培地1 ml を注入する (付着細胞は形態学的に単核球で, 90%以上の細胞が1 μm径のラテックスを貪食した)。37℃ CO₂ インキュベーターで培養後測定する。

IgG感作SRBCの調整: Fcγレセプターの subclass に特異的に結合する抗TNP抗体 (東北大・病理・能勢先生より分与されたもの) を用い, TNP-SRBCをcoatした。(IgG2a-SRBC, IgG2b-SRBC)。

CL発生とフォトカウンティング: 測定機器はBerthold社製Biolumat LB9500Tを用いた。ルミノールはジメチルスルホキシドに溶解後, PBSで希釈, 10 μl を細胞液に加えた (最終濃度 1×10^{-5} M) (ルミノールの濃度は $2.5 \times 10^{-6} \sim 4 \times 10^{-5}$ Mの濃度内で, 濃度依存性にCL値は上昇する)。ベース値をカウントした後に50 μl のIgG-TNP-SRBCを加えフォトカウンティングを継続した。またCLの強さはピークCL値 cpm/ 10^5 cells として表示した。

〔結果及び考察〕

① mlgG2 a はマウス M ϕ 表面の FcRI と bind し, mlgG2 b は FcRII と bind することが知られている為, 常在性 M ϕ (R-M ϕ), 炎症性 M ϕ (チオグリコレート ip : T-M ϕ), 活性型 M ϕ (*Listeria* ip : Lm-M ϕ) を調べると活性型 M ϕ のみ FcRI, FcRII を介した CL を発し, ロゼット法の結果とも一致した。

Lm-M ϕ の経日変化は FcRI, FcRII 共に 3~4 日目から出現し 10 日で消失した。(但 FcRI の出現が若干早い)。なお Lm-M ϕ は R-M ϕ に比べ 125 I-IgG2 a-SRBC, 125 I-IgG2 b-SRBC の binding assay の結果, binding site が上昇していた。また, nude mouse に Lm 生菌を ip 投与 4 日後の PEC M ϕ の FcR_SCL も低い。② 種々の cytokine を *in vitro* で R-M ϕ や T-M ϕ 等に加え培養後 FcR CL を調べると rIFN α A/D により FcRI CL が生じ, FcRII CL は起こらなかった。③ 免疫抑制酸性タンパク (IAP) をマウスに静注すると 12 時間後脾臓に Con A response を抑制する M ϕ が出現するが, この M ϕ は CL test で FcRII 陽性であることが判明した。④ 活性酸素種の検討を阻害剤を用い検討した。TPA-CL は NaN₃ で抑制されず, FcF CL は抑制されたことから CL 発生の違いが示された。⑤ Internalization 阻害剤サイトカラシン B を用い調べると FcR CL は完全に Block されたが続いて TPA を加えると, CL を産生したことより FcR CL の発現には internalization が必要であることが判明した。FcRI は ADCC に関与することが知られ, 又 IFN によりレセプター発現が上昇することが知られている。今回 IgG2 a-SRBC 添加により FcRI を介して Chemiluminescence が発生することを見い出した。また Con A response を抑制する M ϕ は IAP を注射後脾臓に出現するが, IgG2 b-SRBC 添加により, FcRII を介して Chemiluminescence が発生することを見い出した。この FcR レセプターを介した Chemiluminescence の産生機構は複雑であり今後研究されなければならないが *in vitro* で M ϕ を FCS 添加培地で培養後, 少なくともレセプターからの endocytosis が必要な反応である。この方法により, M ϕ の活性化を客観的に判定できると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

微生物感染等における生体防御機構の第1ステップはマクロファージ(M ϕ)の活性化にある。M ϕ 活性化には細胞表面のレセプター機能が重要であり、中でもIgGFcレセプター(FcR)の役割は大きい。FcRにはIgGサブクラスに特異的なレセプター(FcR I, FcR II等)が存在するが、これらFcRの機能とM ϕ 活性化とを直接関係付けて解析した研究は少ない。本研究では従来の感作ヒツジ赤血球(EA)を用いたロゼット法や¹²⁵Iラベル抗体を用いたFcRの同定方法に加え、新たにFcRの機能を検索する簡便な方法〔chemiluminescence (CL)〕を用いてM ϕ の活性化機構を解析した。CL法はEA添加後M ϕ から発する活性酸素を励起状態から基底状態に移移する際のエネルギー(発光)として捕らえる方法である。マウス腹腔にListeria生菌を接種し、3~4日目から腹腔に出現する活性化M ϕ を得た。これら活性化M ϕ において特異的にFcR由来のCL発現が見られた。CL法で検索すると活性化M ϕ ではFcR Iが若干早く発現し、FcR IIがこれに続くことが分った。しかし、これらFcR I, IIの発現は菌接種後10日目には共に消失した。これらの結果は¹²⁵Iラベル法やロゼット法でのFcR発現の結果とも一致した。次に、FcR-CL発現がみられない常在性M ϕ について、*in vitro*でサイトカインを加え培養後に調べたところ、インターフェロン α によりFcRI-CL発現だけが特異的に観察された。一方、FcR II-CL発現がみられるM ϕ は、免疫抑制酸性タンパク質(IAP)を静注し、12時間後の脾臓に出現するM ϕ であり、これらはコンカナバリンAに対するリンパ球の反応を抑制するM ϕ であることが明らかにされた。上記FcR-CL発現は、cytochalasin Bで抑制されることから、FcRからのendocytosisを介した反応と考えられた。

これまでM ϕ は機能の多様性がそのsubpopulationに依存するとされ、明確な活性化の指標を見出し得ないできた。本研究は単にM ϕ のFcレセプター発現のみならず、レセプター機能をエネルギー変換で見極めた点で意義が深く、今後のM ϕ 機能解析に大きく貢献し得るものと期待される。よって、本研究は学位授与に値する。